



<p>(51) 国際特許分類6 A61K 38/16, 48/00, C12N 15/48 // C07K 14/16</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/18426</p> <p>(43) 国際公開日 2000年4月6日(06.04.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00388</p> <p>(22) 国際出願日 1999年1月29日(29.01.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/277361 1998年9月30日(30.09.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 理化学研究所(THE INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL RESEARCH)[JP/JP] 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama, (JP)</p> <p>(71) 出願人; および</p> <p>(72) 発明者 岡 陽子(AIDA, Yoko)[JP/JP] 〒305-0035 茨城県つくば市松代4丁目21番2号 シャレールつくば松代3-105 Ibaraki, (JP) 蒲田政和(KAMATA, Masakazu)[JP/JP] 〒305-0074 茨城県つくば市高野台3-10-24 グリーンヒルサイド松山203 Ibaraki, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目5番5号 KRFビル5階 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 不利にならない開示又は発明の新規性の喪失の例外に関する陳述。</p>	
<p>(54) Title: APOPTOSIS INDUCERS</p> <p>(54) 発明の名称 アポトーシス誘導剤</p> <p>(57) Abstract Apoptosis inducers containing a protein derived from Vpr protein encoded by vpr gene of HIV-1 by deletion of 15 amino acid residues from the C-terminus thereof; and an apoptosis-inducing gene encoding the above protein. Because of being capable of inducing apoptosis of cells, these inducers are useful as drugs for treating cancer or AIDS.</p>		

HIV-1 の vpr 遺伝子がコードする Vpr 蛋白質の C 末端側から 15 個のアミノ酸残基が欠失した蛋白質を含むアポトーシス誘導剤、及び該蛋白質をコードするアポトーシス誘導遺伝子。細胞のアポトーシスを誘導し、癌や AIDS の治療のための医薬として有用である。

PCT に基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載された PCT 加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE ギルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャド
BG ブルガリア	GN ギニア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GW ギニア・ビサウ	MD モルドヴァ	TI タジキスタン
BR ブラジル	HR クロアチア	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BS バルムス	HU ハンガリー	ML マリ	TM トルクメニスタン
CA カナダ	ID インドネシア	MN モンゴル	TR トルコ
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MR モリタニア	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	IL イスラエル	MW マラウイ	UA ウクライナ
CI コートジボアール	IN インド	MX メキシコ	UG ウガンダ
CM カメルーン	IS アイスランド	NE ニジェール	US 米国
CN 中国	IT イタリア	NL オランダ	UZ ウズベキスタン
CR コスタ・リカ	JP 日本	NO ノルウェー	VN ヴェトナム
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュージーランド	YU ユーゴスラビア
CZ チェコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	ZA 南アフリカ共和国
DE ドイツ	KR 韓国	PT ポルトガル	ZW ジンバブエ
DK デンマーク		RO ルーマニア	

明 細 書

アポトーシス誘導剤

技術分野

本発明はアポトーシス誘導作用を有する蛋白質及び該蛋白質をコードする遺伝子に関するものである。

背景技術

アポトーシス (Apoptosis) は、物理的外傷や化学的毒物などにより生じる壊死 (Necrosis) とは異なり、生理学上の種々の条件下で生じる細胞死であり (Kerr, J.F. and Wyllie, A.H., Br. J. Cancer, 26, pp.239-257, 1972)、プログラム細胞死 (Programmed Cell Death) とも呼ばれる。アポトーシスは、細胞障害性 T 細胞による細胞障害、放射線照射、腫瘍壊死因子 (TNF) などのサイトカイン類、抗 CD3 抗体などによって誘導されるほか、悪性腫瘍の自然退縮においても確認されている。細胞のアポトーシスを人為的に誘導する遺伝子や遺伝子産物を用いることにより、遺伝子治療や特定の癌細胞の破壊などが可能になると期待される。

一方、ヒト後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因ウイルスであるヒト後天性免疫不全症ウイルス 1 型 (HIV-1) は、構造遺伝子及び調節遺伝子に加え、自身の複製に必須ではないアクセサリ遺伝子 (nef, vpr, vpu, vif) を有している。アクセサリ遺伝子の一つである vpr の遺伝子産物 (蛋白質 Vpr) は、ウイルス感染効率の上昇及び HIV 潜伏感染細胞からのウイルス産生を惹起するなど、AIDS 発症のキープクターとして注目されている。さらに、蛋白質 Vpr は、細胞の増殖抑制、分化誘導、アポトーシス誘導、アポトーシス抑制、核の多倍体化誘導などの極めて多様な生理作用を有することも明らかにされている。

発明の開示

本発明の課題は、アポトーシス誘導作用を有する遺伝子及びその遺伝子産物を提供することにある。本発明者は上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、HIV-1 のアクセサリ遺伝子 vpr がコードする 96 アミノ酸残基からなる Vpr 蛋白質のカルボキシル末端の 15 アミノ酸残基を欠失した変異体が、極めて高いアポトーシス誘導活性を有しており、その結果として細胞増殖抑制作用を発揮することを見出した。本発明はこの知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明は、HIV-1 の vpr 遺伝子がコードする Vpr 蛋白質の C 末端側から 15 個のアミノ酸残基が欠失した蛋白質を含むアポトーシス誘導剤を提供するものである。本発明の別の態様によれば、上記の蛋白質のアミノ酸配列において数個のアミノ酸が置換、挿入、及び/又は欠失しており、かつアポトーシス誘導活性を有する蛋白質を含むアポトーシス誘導剤が提供される。また、本発明により、上記の各蛋白質をコードするアポトーシス誘導遺伝子が提供される。

別の観点からは、上記の蛋白質又は上記の遺伝子を用いて細胞のアポトーシスを誘導する方法；上記の遺伝子を含む組換えベクター；上記の組換えベクターを用いて細胞のアポトーシスを誘導する方法が提供される。

さらに別の観点からは、上記の蛋白質を有効成分として含む医薬が提供される。上記蛋白質を有効成分として含む医薬は、例えば、抗癌剤又は抗 A I D S 剤として有用である。また、上記組換えベクターを有効成分として含む医薬も提供される。この医薬は、癌や A I D S に対して、遺伝子治療のための医薬として用いることができる。さらに、癌又は A I D S の治療方法であって、上記蛋白質又は上記組換えベクターの有効量を患者に投与する工程を含む方法、及び上記医薬の製造のための上記蛋白質又は上記遺伝子の使用も本発明により提供される。

発明を実施するための最良の形態

本発明の蛋白質は、HIV-1 の vpr 遺伝子がコードする Vpr 蛋白質において、C 末端側から 15 個のアミノ酸残基が欠失した 81 アミノ酸残基からなる蛋白質であ

る（以下、本明細書においてこの蛋白質を「C81 変異蛋白質」と呼ぶ場合がある）。この C81 変異蛋白質は実施例に記載した方法に従って容易に製造することができる。C81 変異蛋白質は、HIV-1 の vpr 遺伝子の核酸配列又は Vpr 蛋白質のアミノ酸配列（Adachi, A. et al., J. Virol., 59, pp.284-291, 1986）を利用することによっても製造可能である。

本発明の C81 変異蛋白質は、Vpr 蛋白質に比べてアポトーシス誘導作用が著しく高められていることを特徴としている。本発明の C81 変異蛋白質の高められたアポトーシス誘導作用は、本明細書の実施例の方法に従って当業者が容易に確認することができる。また、本発明の蛋白質は、Vpr 蛋白質と異なり、実質的に G 2 期停止（arrest）能を有しないことを特徴としている。

上記の C81 変異蛋白質のアミノ酸配列において、数個のアミノ酸残基が置換、挿入、及び／又は欠失したアミノ酸配列を有し、C81 変異蛋白質と同様のアポトーシス誘導作用を有する蛋白質（以下、「改変蛋白質」と呼ぶ場合がある）も本発明の範囲に含まれる。本発明の遺伝子は C81 変異蛋白質又は上記改変蛋白質をコードする核酸配列からなる DNA 配列又は RNA 配列のいずれをも包含するが、これらは上記文献記載の方法に従って容易に入手することが可能である。

上記の改変蛋白質は、C81 変異蛋白質のアミノ酸配列をコードする DNA を有する大腸菌などを N-ニトロ-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンなどの薬剤を用いて突然変異処理し、菌体から改変蛋白質をコードする遺伝子を回収した後、通常の遺伝子発現操作を行うことによって製造できる。また、前記遺伝子を亜硫酸ナトリウムなどの薬剤で直接処理するか、あるいは部位特異的変異法（Kramer, W. et al., Methods in Enzymology, 154, 350, 1987）やリコンビナント PCR 法（PCR Technology, Stockton press, 1989）などの手法によってヌクレオチドの欠失、置換、又は付加を直接導入してもよい。

本発明の蛋白質はアポトーシス誘導剤として有用である。例えば、癌細胞においてアポトーシスを誘導し、癌細胞を死滅させるための医薬として用いることができる。また、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）潜伏感染細胞の排除、及び該技

術の開発にも有用である。従って、本発明の蛋白質を含む医薬は、癌の予防及び／又は治療や、後天性免疫不全症候群（AIDS）の予防及び／又は治療に用いることができる。本発明の医薬の投与方法、投与量、製剤形態などは、当業者により適宜選択可能であり、特に限定されることはない。

上記の医薬としての利用の目的のために、本発明の蛋白質は、他のポリペプチドと融合されていてもよい。本発明の蛋白質のアミノ酸配列を部分配列として含む融合蛋白質、及び該融合蛋白質をコードする遺伝子も本発明の範囲に包含される。例えば、癌細胞などの標的細胞に対して特異的なモノクローナル抗体やそのフラグメントとの融合蛋白質を製造することにより、標的細胞において特異的にアポトーシスを惹起させることが可能になる。また、本発明の蛋白質は、アポトーシス耐性が関与する疾患などの治療への有用性が期待され、生化学、遺伝子工学などの分野における試薬としても有用である。

本発明の遺伝子は、本発明の蛋白質の製造に有用であるほか、アポトーシス耐性が関与する疾患に対する遺伝子治療に用いることができる。例えば、癌やAIDSの予防及び／又は治療のための遺伝子療法に用いることができる。遺伝子療法の手技は特に限定されないが、通常は、本発明の遺伝子をベクターに組み込み、生体内に該組換えベクターを導入して本発明の遺伝子を発現させればよい。生体内に遺伝子を導入するためのベクターは種々知られており、当業者は適宜のベクターを選択することができる。また、特定の細胞において遺伝子の発現を制御するための手法も当業者に利用可能である。そのほか、本発明の遺伝子を HIV-1 LTR の下流に連結し、抗 HIV gp120 抗体結合リポソームに封入して生体内に導入することにより、HIV 感染細胞を直接的かつ特異的に破壊することが可能である。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

1. 材料と方法

HIV-1 感染性 DNA クローン pNL432 の vpr 遺伝子断片の 5' 端に Flag 配列を連結後、高度発現ベクター pME18neo に挿入した。以下、これらの手順を説明する。

(1) C81 変異蛋白質をコードする遺伝子 (以下、「C81 変異遺伝子」と呼ぶ。) の増幅用に設計したプライマーは以下の通りである。

Sense Primer: 5'-GAAGATATCCGAACAAGCCCCAGAAGAC-3'

Anti-sense Primer: 5'-GGTCTAGATCATATTCTGCTATGTCGACAC-3'

接着配列に加え、sense プライマーの 5' 端には Flag-Tag 接続のための EcoRV site を、antisense プライマーの 3' 端にはサブクローニングベクター接続のための XbaI site を付加した (酵素サイトは下線で示す)。このプライマーを用いて HIV-1 分離株 NL43 の感染性 DNA クローン pNL432 (Adachi, A. et al., J. Virol., 59, pp. 284-291, 1986) を鋳型とした PCR 法を行い、C81 変異遺伝子断片を増幅した。

(2) 鋳型 DNA 1 µg、PCR 緩衝液 (10mM Tris-HCl pH8.3、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.001% gelatin)、0.2mM dNTP、プライマー各 50pmol および Ampli Taq polymerase (Perkin Elmer Cetus) 2.5 units を含む反応液中で 94℃ で 5 分間熱変性後、94℃ で 1 分、54℃ で 1 分、72℃ で 2 分の増幅処理を 35 回行い、72℃ で 10 分の伸長反応を行った。得られた PCR 産物は、EcoRV および XbaI で 4 時間以上処理後、アガロースゲル電気泳動により DNA を分画後、GENECLEAN II KIT を用いて目的 DNA 断片を溶出、精製した。

(3) 次に、増幅断片と Flag-Tag 配列とを接続するため、PCR 増幅 vpr 遺伝子断片をあらかじめ Flag-Tag を接続し EcoRV および XbaI 処理された pBluescript SK+-II ベクターにライゲートした後、大腸菌コンピテントセル XLI-Blue に形質転換した。次に、Fvpr/pBluescript SK+-II から NotI および XhoI 切断部位で C81 変異遺伝子の DNA 断片を切り出し、GENECLEAN II KIT を用いて目的 DNA 断片を溶出し、pME18Neo にライゲートし、XLI-Blue に導入して形質転換細胞を得た。プラスミド DNA は SDS 法により調製し、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法を用いて精製した。

これと野生型及びコントロールベクターをエレクトロポレーション法にて

HeLa 細胞に導入した。細胞増殖に及ぼす効果をコロニー形成法により解析した。導入 12 時間後に 5×10^4 個の細胞を 10 cm シャーレに蒔き、G418 を含む選択培地にて 12 日間培養し、メタノール固定後にギムザ染色を行い、コロニー数を算出した。この時、 β -Gal 染色を用いて各変異体につき導入効率を算出し、コロニー数を補正した。細胞周期はフローサイトメトリー法により解析した。

C81 変異遺伝子発現プラスミドを GFP 発現プラスミドと一過性に共導入し、48 時間後に細胞を 1% ホルムアミド/PBS に続いて 70% メタノールを用いて固定後、PI 染色液で染色して FACS 解析した。GFP の蛍光をマーカーとして C81 変異遺伝子導入細胞と非導入細胞を選別し、各分画の DNA 含量を調べた。この時、+、野生型と同等の G2 期停止能を持つ；±、野生型より弱い；-、持たない、として区分した。同様に、導入 48 時間後に抗 Flag 抗体あるいは抗ミニクロソームメンテナンス (MCM) 抗体で二重蛍光染色し共焦点レーザー顕微鏡で観察した。MCM 陰性：G2 期細胞と判定した。

増殖している細胞の検出のため、細胞をブロモデオキシウリジン (BrdU) 存在下で 30 分間培養後、抗 BrdU 抗体で蛍光染色した。さらに、導入 48 時間後、ピオチン標識アネキシン V 及び PE 標識ストレプトアビジンで蛍光染色した。GFP 陽性細胞を C81 変異遺伝子導入細胞のマーカーとして共焦点レーザー顕微鏡で観察した。アネキシン V 陽性：アポトーシス誘導細胞と判定した。

2. 結果

Vpr 蛋白質の C 末端から 15 アミノ酸残基を欠失した C81 変異蛋白質をコードする C81 変異遺伝子を導入した HeLa 細胞では、G2 期停止が起こらないにも関わらず、コロニー形成能がコントロールベクター導入細胞より約 30% 低下していた。また、C 末端欠失 vpr 導入細胞における BrdU の取り込みは、コントロール導入細胞と比較して顕著に低下していた。さらに、細胞を G2 期マーカーである MCM に対する抗血清を用いて蛍光染色した結果、この細胞増殖抑制活性が G2 期停止によるものではないことが明らかとなった。

以上の結果から、C 末端欠失 Vpr 導入細胞では G2 期停止とは異なる機序によ

って細胞増殖が著しく低下していることが確認された。そこで、アネキシン-V
 ビオチンによる細胞染色を行ったところ、C 末端欠失 Vpr ではアポトーシス細胞
 の割合が野生型 Vpr に比べ顕著に、また早く増加していた。Vpr 蛋白のカルボキ
 シル末端の 15 アミノ酸残基を欠失した変異体は、著しく高いアポトーシス活性
 を誘導することが明らかとなった。

表 1

検査項目	発現ベクター導入細胞の性状		
	C81 変異体	野生体	コントロールベクター
G2 期停止 ¹⁾	—	+	—
抗-MCM 抗体による蛍光染色 陽性細胞の% ²⁾	63.6%	18.3%	80.0%
コロニー形成能 ³⁾	72.8%	7.6%	100.0%
BrdU を取り込んだ細胞の% ⁴⁾	20.1%	19.5%	34.8%
アネキシン-V ビオチンによ る細胞染色陽性細胞の% ⁵⁾	20.7%	1.4%	1.3%

¹⁾ +、野生型と同等の G2 期停止能を有する；±、野生型より弱い；—、G2 期停
止能を有しない

²⁾ MCM 陰性：G2 期細胞

³⁾ β -Gal 染色を用いて各変異体につき導入効率を算出しコロニー数を補正し、
コントロールベクター導入細胞のコロニー数を 100 として%で表示した

⁴⁾ 抗 BrdU 抗体陽性：増殖細胞

⁵⁾ アネキシン-V 陽性：アポトーシス誘導細胞

請 求 の 範 囲

1. HIV-1 の vpr 遺伝子がコードする Vpr 蛋白質の C 末端側から 15 個のアミノ酸残基が欠失した蛋白質を含むアポトーシス誘導剤。
2. 請求の範囲第 1 項に記載の蛋白質のアミノ酸配列において数個のアミノ酸が置換、挿入、及び／又は欠失しており、かつアポトーシス誘導活性を有する蛋白質を含むアポトーシス誘導剤。
3. 実質的に G2 期停止能を有しない上記蛋白質を含む請求の範囲第 2 項に記載のアポトーシス誘導剤。
4. 請求の範囲第 1 項ないし第 3 項のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードするアポトーシス誘導遺伝子。
5. HIV-1 の vpr 遺伝子がコードする Vpr 蛋白質の C 末端側から 15 個のアミノ酸残基が欠失した蛋白質を用いて細胞のアポトーシスを誘導する方法。
6. 請求の範囲第 4 項に記載の遺伝子を含む組換えベクター。
7. 請求の範囲第 6 項に記載の組換えベクターを用いて細胞のアポトーシスを誘導する方法。
8. 請求の範囲第 1 項ないし第 3 項に記載の蛋白質を有効成分として含む医薬。
9. 癌又は A I D S の予防及び／又は治療のために用いる請求の範囲第 8 項に記載の医薬。
10. 請求の範囲第 6 項に記載の組換えベクターを有効成分として含む医薬。
11. 癌又は A I D S の予防及び／又は治療のために用いる請求の範囲第 10 項に記載の医薬。
12. 癌又は A I D S の予防及び／又は治療方法であって、請求の範囲第 1 項ないし第 3 項に記載の蛋白質の治療有効量を患者に投与する工程を含む方法。
13. 癌又は A I D S の予防及び／又は治療方法であって、請求の範囲第 6 項に記載の組換えベクターの治療有効量を患者に投与する工程を含む方法。

(23) Statement concerning non prejudicial disclosure or exception to lack of novelty.

不利にならない開示又は発明の新規性の喪失の例外に関する陳述

開示の日 : 1998年8月 (08.98)
 開示の場所 : RIKEN Review 18巻、1998年8月号
 第37頁～第38頁
 開示の種類 : RIKEN Review, No.18, August 1998, pp.37-38
 刊行物発表
 Publication in the Journal
 開示の日 : 1998年9月10日 (10.09.98)
 開示の場所 : 第46回日本ウイルス学会学術集会・総会
 プログラム・抄録集
 演題番号 1A21
 Program and Abstract of the 46th General
 Meeting of the Japanese Society for Virology
 開示の種類 : 刊行物発表
 Publication in the Abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00388

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁶ A61K38/16, A61K48/00, C12N15/48 // C07K14/16		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁶ A61K38/16, A61K48/00, C12N15/48 // C07K14/16		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), MEDLINE (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AYYAVOO, Velpandi, et al., "HIV-1 Vpr suppresses immune activation and apoptosis through regulation of nuclear factor. kappa. B." Nat. Med. (N. Y.), (1997) Vol. 3, No. 10, pages 1117 to 1123	1-4, 6, 8-11
A	STEWART, Sheila A., et al., "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest." J. Virol., (1997) Vol. 71, No. 7, pages 5579 to 5592	1-4, 6, 8-11
A	ARUNAGIRI, C. et al., "A C-terminal domain of HIV-1 accessory protein Vpr is involved in penetration, mitochondrial dysfunction and apoptosis of human CD4+ lymphocytes." Apoptosis, (1997) Vol. 2, No. 1, pages 69 to 76	1-4, 6, 8-11
A	HE, Jianglin, et al., "Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity." J. Virol., (1995) Vol. 69, No. 11, pages 6705 to 6711	1-4, 6, 8-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 20 April, 1999 (20. 04. 99)		Date of mailing of the international search report 11 May, 1999 (11. 05. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00388

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOWETT, Jeremy B. M., et al., "The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle." J. Virol., (1995) Vol. 69, No. 10, pages 6304 to 6313	1-4, 6, 8-11 - -

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/00388

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 5, 7, 12, 13

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 5, 7, 12 and 13 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT,

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl.* A61K38/16, A61K48/00, C12N15/48 // C07K14/16		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl.* A61K38/16, A61K48/00, C12N15/48 // C07K14/16		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	AYYAVOO, Velpandi, et al., 'HIV-1 Vpr suppresses immune activation and apoptosis through regulation of nuclear factor. kappa. B.' Nat. Med. (N. Y.), (1997) Vol.3, No.10, pages 1117 to 1123	1-4, 6, 8-11
A	STEWART, Sheila A., et al., 'Human immunodeficiency virus, type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest.' J. Virol., (1997) Vol.71, No.7, pages 5579 to 5592	1-4, 6, 8-11
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日以前の文献または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日		国際調査報告の発送日
20. 04. 99		11.05.99
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 森井 陸信 電話番号 03-3581-1101 内線 3452
		4C 9455

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ARUNAGIRI, C. et al., 'A C-terminal domain of HIV-1 accessory protein Vpr is involved in penetration, mitochondrial dysfunction and apoptosis of human CD4+ lymphocytes.' Apoptosis, (1997) Vol.2, No.1, pages 69 to 76	1-4, 6, 8-11
A	HE, Jianglin, et al., 'Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity.' J. Virol., (1995) Vol.69, No.11, pages 6705 to 6711	1-4, 6, 8-11
A	JOWETT, Jeremy B. M., et al., 'The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle.' J. Virol., (1995) Vol.69, No.10, pages 6304 to 6313	1-4, 6, 8-11

第1欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 5, 7, 12, 13 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲5, 7, 12及び13は、治療による人体の処置方法に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39(iv)の規定により、この国際調査期間が調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第2欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。